

NGHIÊN CỨU TÁI SINH CHỒI *IN VITRO* VÀ NUÔI TRỒNG CÂY LAN GẤM (*ANOECTOCHILUS FORMOSANUS* HAYATA)

Phan Xuân Huyền[✉], Nguyễn Thị Phượng Hoàng

Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[✉] Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: phanxuanhuyen1974@gmail.com

Ngày nhận bài: 28.8.2016
Ngày nhận đăng: 24.3.2017

TÓM TẮT

Lan gấm (*Anoectochilus formosanus* Hayata) là một trong những loài thảo dược quý và tốt cho sức khỏe của con người. Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* và nuôi trồng cây lan gấm. Kết quả cho thấy, môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA, 50 g/l chuối, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, pH 5,8 là tốt nhất cho phép tái sinh chồi *in vitro*, với 5,20 chồi/mẫu, chiều cao chồi 3,38 cm, khối lượng tươi 0,26 g/mẫu. Mẫu mang một đốt thân là nguồn vật liệu thích hợp nhất trong nhân giống *in vitro*. Vị trí đốt thân thứ hai đến thứ sáu là nguồn vật liệu thích hợp nhân giống *in vitro*. Nồng độ IBA từ 0 – 1 mg/l đều thích hợp cho phép tái sinh rễ *in vitro*, với tỉ lệ 100%. Vụn xơ dừa là giá thể tốt nhất cho phép thích nghi của cây con, với tỉ lệ sống đạt 100%, chiều cao cây 5,82 cm, chiều dài rễ 3,64 cm. Đối với thí nghiệm nuôi trồng cây lan gấm ở điều kiện *ex vitro*, kết quả cho thấy, phun phân Nitrophoska với nồng độ 2 g/l theo định kỳ mỗi tuần một lần là tốt nhất cho phép sinh trưởng của cây, với chiều cao cây 11,20 cm, chiều dài rễ 7,80 cm, khối lượng tươi 1,82 g/cây, tỉ lệ sống 100% và đốn mút là giá thể nuôi trồng cây lan gấm tốt nhất, với chiều cao cây 12,50 cm, chiều dài rễ 8,00 cm, khối lượng tươi 1,94 g/cây, tỉ lệ sống 100%.

Từ khóa: Cây lan gấm, giá thể, phân bón, sự tái sinh chồi, sự sinh trưởng của cây

MỞ ĐẦU

Ngày nay, cùng với sự phát triển của xã hội, con người có xu hướng sử dụng các loại thảo dược để cải thiện sức khỏe và chữa bệnh. Trong đó, cây lan gấm là một loại thảo dược quý hiếm, có tác dụng chữa bệnh và tăng cường sức khỏe của con người (Võ Văn Chi, 1997; Phạm Hoàng Hộ, 2000). Lan gấm có nhu cầu tiêu thụ lớn và có giá trị kinh tế cao, do đó, cây lan gấm trong tự nhiên bị khai thác một cách triệt để, thêm vào đó, nạn phá rừng để lấy gỗ và trồng trọt làm cho khu phân bố cây lan gấm ngày càng thu hẹp, dẫn đến có nguy cơ tuyệt chủng cao (Nghị định số 32/2006/NĐ-CP, 2006; Sách đỏ Việt Nam – Phần thực vật, 2007). Vì vậy, việc tiến hành nghiên cứu nhân giống *in vitro* và nuôi trồng cây lan gấm tạo ra nguồn nguyên liệu phục vụ trong lĩnh vực y học, thực phẩm, mỹ phẩm là vấn đề cấp bách và rất cần thiết.

Ở nước ta hiện nay đã có nhiều công bố nhân giống *in vitro* một số loài lan gấm có giá trị dược liệu như: loài *A. setaceus* (Nguyễn Quang Thạch, Phí Thị Cẩm Miện, 2012; Đỗ Mạnh Cường *et al.*, 2015; Trần Thị Hồng Thúy *et al.*, 2015), loài *A. roxburghii*

(Phùng Văn Phê *et al.*, 2010; Trương Thị Bích Phượng, Phan Ngọc Khoa, 2013), loài *A. lylei* (Phan Xuân Bình Minh *et al.*, 2015), nhưng về nuôi trồng cây lan gấm thì chưa công bố. Đối với loài *A. formosanus* ở nước ta hiện nay chưa công bố nghiên cứu nhân giống và nuôi trồng, nhưng trên thế giới đã có nhiều công bố nhân giống *in vitro* (Ho *et al.*, 1987; Tai, 1987; Chow *et al.*, 1982; Shiau *et al.*, 2002; Ket, 2003; Ket *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2010) và nuôi trồng ở điều kiện *ex vitro* (Gangaprasad *et al.*, 2000; Shiau *et al.*, 2002; Ket, 2003; Chang *et al.*, 2007; Cheng, Chang, 2009). Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu tái sinh chồi *in vitro* và nuôi trồng loài *A. formosanus* ở điều kiện *ex vitro*. Kết quả của nghiên cứu này góp phần xây dựng quy trình nhân giống *in vitro* và nuôi trồng cây lan gấm ở điều kiện *ex vitro*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Loài *A. formosanus in vitro* (Hình 1a) đang nghiên cứu tại phòng Công nghệ thực vật, Viện

Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên được dùng làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy

MS (Murashige, Skoog, 1962) là môi trường được sử dụng trong nghiên cứu *in vitro*, tùy theo mục đích của các thí nghiệm mà bổ sung các chất như: BA (6-benzyl adenin), IBA (Indole-3-butyric), than hoạt tính, chuối (chuối mốc chín), sucrose và agar. Đối với nuôi cấy *in vitro*, thời gian chiếu sáng 10 giờ/ngày, cường độ ánh sáng $34 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm không khí 75 – 85%. Ở giai đoạn vườn ươm, sử dụng lưới đen che 80 – 85% ánh sáng, nhiệt độ 20 – 25°C, độ ẩm 80 – 85%.

Phương pháp

Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh chồi *in vitro*

Những đốt thân của cây *in vitro* (Hình 1a) được cấy trên môi trường MS bổ sung 0; 0,1; 0,5; 1; 2; 3 mg/l BA, 50 g/l chuối, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 9 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 30 mẫu, sau 2 tháng nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, khối lượng tươi/mẫu (g).

Khảo sát ảnh hưởng của kích thước mẫu đến sự tái sinh chồi *in vitro*

Những mẫu mang 1, 2, 3 và 4 đốt thân của cây *in vitro* (Hình 1a) môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA, 50 g/l chuối, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 2 tháng nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, khối lượng tươi/mẫu (g).

Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh chồi *in vitro*

Các vị trí đốt của cùng một cây lan gấm (Hình 1a) được đánh số theo thứ tự từ ngọn đến gốc được cấy trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA, 50 g/l chuối, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 15 mẫu, sau 2 tháng nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao chồi (cm), số chồi/mẫu, khối lượng tươi/mẫu (g).

Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tái sinh rễ *in vitro*

Những chồi ngọn *in vitro* (Hình 1a), có chiều dài

khoảng 3 cm được cấy trên môi trường MS có bổ sung 0; 0,1; 0,5 và 1 mg/l IBA, 30 g/l sucrose, 9 g/l agar, 1 g/l than hoạt tính, pH 5,8. Mỗi nghiệm thức cấy 20 chồi, sau 1 tháng nuôi cấy tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là số rễ/chồi, chiều dài rễ (cm) và tỉ lệ tạo rễ (%).

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến sự thích nghi của cây *in vitro* ở ngoài vườn ươm

Những cây lan gấm *in vitro* từ thí nghiệm trên có đầy đủ thân lá rễ và có chiều cao khoảng 4 cm (Hình 1b) được trồng trên giá thể vụn xơ dừa và giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% đất mùn. Mỗi nghiệm thức trồng 60 cây, sau 2 tháng nuôi trồng tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi/cây (g) và tỉ lệ sống (%).

Khảo sát ảnh hưởng của phân Nitrophoska đến sự sinh trưởng của cây ở ngoài vườn ươm

Những cây lan gấm *in vitro* đã thích nghi ở giai đoạn vườn ươm, có chiều cao cây khoảng 6 cm và chiều dài rễ khoảng 4 cm (Hình 2a) được trồng trên giá thể vụn xơ dừa. Phân Nitrophoska (N: 25%, P₂O₅: 10%, K₂O: 17,5%, Fe: 0,050%, Zn: 0,019%, Mn: 0,050%, B: 0,011%, Cu: 0,019%, Mo: 0,001%.) được sử dụng với nồng độ 1 g/l và 2 g/l, phun qua lá theo định kỳ mỗi tuần 1 lần (Công ty TNHH Nông Thành, TP. HCM). Mỗi nghiệm thức trồng 60 cây, sau 4 tháng nuôi trồng tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi/cây (g) và tỉ lệ sống (%).

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng của cây ở ngoài vườn ươm

Những cây lan gấm *in vitro* đã thích nghi ở giai đoạn vườn ươm, có chiều cao cây khoảng 6 cm và chiều dài rễ khoảng 4 cm (Hình 2a) được trồng trên giá thể dớn mút và vụn xơ dừa, phun phân Nitrophoska với nồng độ 2 g/l qua lá theo định kỳ mỗi tuần 1 lần. Mỗi nghiệm thức trồng 60 cây, sau 4 tháng nuôi trồng tiến hành thu số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm), khối lượng tươi/cây (g) và tỉ lệ sống (%).

Xử lý số liệu

Số liệu của các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm thống kê SPSS (bản 15.0) trong Duncan's test và T-test (Duncan, 1955), với mức độ tin cậy $P \leq 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh chồi *in vitro*

Khả năng tái sinh chồi *in vitro* từ đốt thân sau 2 tháng nuôi cấy được thể hiện trên Bảng 1. Kết quả cho thấy, đốt thân nuôi cấy trên tất cả các môi trường đều tái sinh chồi, tuy nhiên ở các môi trường bổ sung các nồng độ BA khác nhau thì có sự tái sinh khác nhau. Sự tái sinh chồi ở thí nghiệm này cũng tương đồng với kết quả của Ket (2003), Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012) khi sử dụng BA nghiên cứu nhân giống *in vitro* cây lan gấm cho thấy ở những nồng độ khác nhau thì có sự tái sinh chồi khác nhau. Môi trường bổ sung 1 mg/l BA là tốt nhất, với chiều cao chồi 3,38 cm, số chồi 5,20 chồi/mẫu, khối lượng tươi 0,26 g/mẫu. Khi tăng nồng độ BA từ 0 – 1 mg/l thì chiều cao chồi, số chồi và khối lượng tươi của chồi tăng lên, nhưng khi nồng độ BA tăng lên 2 – 3 mg/l thì chiều cao chồi, số chồi và khối lượng tươi giảm xuống. Điều này có thể giải thích, khi nồng độ BA thấp thì kích thích sự tái sinh chồi, tăng trưởng chiều cao và khối lượng tươi của chồi, nhưng khi nồng độ BA tăng cao thì xảy ra quá trình ngược lại. Chất kích thích sinh trưởng BA nói riêng và các chất kích thích sinh trưởng khác nói chung đều có tác dụng theo một qui luật chung, khi tăng

dần nồng độ thì kích thích sự tái sinh chồi của mẫu, đến nồng độ tối ưu thì số chồi tái sinh cao nhất, nhưng khi vượt qua nồng độ tối ưu thì sẽ gây ra hiện tượng ức chế tái sinh chồi. Chồi tái sinh từ các mẫu cấy đều sinh trưởng tốt, thân chồi mọc 2 đến 3 rễ và rễ mọc nhiều lông hút (Hình 1c₁, 1c₂, 1c₃, 1c₄, 1c₅, 1c₆). So sánh với các nghiên cứu đã công bố thì kết quả của thí nghiệm này tương đồng với nghiên cứu của Ket *et al.*, (2004) khi nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *A. formosanus*, BA ở nồng độ 1 mg/l tái sinh chồi cao nhất, với 5,10 chồi/mẫu. Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012) nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *A. setaceus* cũng có kết quả tương tự, khi BA ở nồng độ 1 mg/l thì tái sinh chồi nhiều nhất, với 5,22 chồi/mẫu. Phan Xuân Bình Minh *et al.*, (2015) nghiên cứu bảo tồn và phát triển loài *A. lylei* đã sử dụng BA để nuôi cấy cho hệ số nhân giống cao nhất là 9,12 mầm/mẫu. Phùng Văn Phê *et al.*, (2010) cũng nghiên cứu nhân giống *in vitro* loài *A. roxburghii*, kết quả cho thấy hệ số nhân giống là 4. Từ kết quả của những nghiên cứu trên cho thấy, trong cùng một chi lan gấm những loài khác nhau thì có sự tái sinh chồi khác nhau.

Như vậy, môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA là tốt nhất đến sự tái sinh chồi *in vitro* từ đốt thân của loài *A. formosanus*.

Bảng 1. Ảnh hưởng của BA đến sự tái sinh chồi *in vitro* sau 2 tháng nuôi cấy.

Chất kích thích sinh trưởng BA (mg/l)	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Khối lượng tươi/mẫu (g)
0,0	2,25 ^e	1,40 ^d	0,12 ^c
0,1	3,00 ^c	2,70 ^c	0,18 ^{cd}
0,5	3,22 ^b	4,10 ^b	0,22 ^b
1,0	3,38 ^a	5,20 ^a	0,26 ^a
2,0	2,87 ^{cd}	4,00 ^b	0,20 ^{bc}
3,0	2,74 ^d	2,30 ^c	0,16 ^d

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b, c, d, e) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test

Khảo sát ảnh hưởng của kích thước mẫu đến sự tái sinh chồi *in vitro*

Mẫu thí nghiệm được cấy trên môi trường MS có bổ sung 1 mg/l BA, 50 g/l chuối, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l sucrose, pH 5,8. Khả năng tái sinh chồi *in vitro* từ đốt thân sau 2 tháng nuôi cấy được thể hiện trên bảng 2. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu cấy đều tái sinh chồi và sinh trưởng tốt, tuy nhiên ở những mẫu cấy khác nhau thì có sự tái sinh khác nhau. Mẫu mang 1 đốt thân tái sinh 5,30 chồi, mẫu mang 2 đốt thân tái sinh 8,80 chồi (trung bình 1 đốt thân tái sinh

4,40 chồi), mẫu mang 3 đốt thân tái sinh 12,20 chồi (trung bình 1 đốt thân tái sinh 4,10 chồi), mẫu mang 4 đốt thân tái sinh 15,40 chồi (trung bình 1 đốt thân tái sinh 3,85 chồi). Qua đây cho thấy, mẫu mang 1 đốt thân tái sinh chồi nhiều hơn mẫu mang 2, 3 và 4 đốt thân (trung bình của 1 đốt thân). Kết quả cũng cho thấy, khi mẫu càng mang nhiều đốt thân thì sự tái sinh chồi và khối lượng tươi của chồi càng giảm. Điều này có thể giải thích, mẫu mang nhiều đốt thân hấp thu chất dinh dưỡng và chất kích thích sinh trưởng trong môi trường nuôi cấy để tái sinh và tăng trưởng kích thước chồi thấp hơn những mẫu mang

một đốt thân. Cũng có thể giải thích, những mẫu có kích thước lớn chứa chất kích thích sinh trưởng nội sinh cao hơn sẽ ảnh hưởng không tích cực đến việc tái sinh và sinh trưởng chồi. Về số liệu cho thấy chiều cao chồi của các mẫu cây có sự khác nhau nhưng theo xử lý thống kê thì không có sự khác biệt. Tất cả các mẫu cây đều có chung đặc điểm là từ đốt thân tái sinh một chồi chính, sau đó sinh trưởng phát triển nhiều chồi bên. Chồi có sức sinh trưởng mạnh, từ đốt thân mọc nhiều rễ và rễ có nhiều lông hút (Hình 1d₁, 1d₂, 1d₃, 1d₄). Hiện nay chưa có công bố nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước mẫu đến sự tái sinh và sinh trưởng chồi trên đối tượng cây lan gấm, nhưng đã có nhiều công bố ở những cây khác. Mazri (2013) nghiên cứu nhân giống cây chà là đã sử dụng những cụm chồi có kích cỡ khác nhau (2, 3, 4 và 5 chồi/cụm) trên môi trường MS, môi trường cây gỗ (WPM) và NM (Nitsch medium), sau 3 tháng nuôi cấy kết quả cho thấy, tất cả những cụm mang 2 chồi tái sinh nhiều hơn những cụm 3, 4 và 5 chồi (tính

trung bình trên 1 chồi) ở 3 môi trường trên. Gupta *et al.*, (2004) nghiên cứu tái sinh cây từ các phôi chưa trưởng thành của cây cỏ Sudan ở những kích thước khác nhau (0,7 – 1 mm; 1,1 – 1,5 mm; 1,6 – 2 mm; 2,1 – 2,5 mm), kết quả cho thấy, những mẫu có kích thước 0,7 – 1,5 mm tái sinh chồi nhiều hơn mẫu 1,6 – 2,5 mm. Shahinul Islam (2010) nghiên cứu kích thước phôi để cải thiện khả năng tái sinh chồi của cây lúa mì như: lớn (> 2,0 – 3,0 mm), trung bình (1,0 – 1,9 mm) và nhỏ (<1,0 mm), kết quả cho thấy, kích thước của phôi là một yếu tố quan trọng để tái sinh có hiệu quả, phôi lớn sản sinh ra tỷ lệ phần trăm các cây trồng xanh và phôi nhỏ tái sinh thấp. Qua đây cho thấy sự tái sinh chồi của mẫu có kích thước nhỏ hay lớn không theo một quy luật, nó phụ thuộc vào từng loài và nguồn mẫu.

Như vậy, mẫu mang một đốt thân là nguồn vật liệu thích hợp nhất trong nhân giống *in vitro* loài *A. formosanus*.

Bảng 2. Ảnh hưởng của kích thước mẫu đến sự tái sinh chồi *in vitro* sau 2 tháng nuôi cấy.

Kích thước mẫu	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Khối lượng tươi/mẫu (g)
Mẫu mang 1 đốt	3,41 ^{a*}	5,30 ^d	0,24 ^d
Mẫu mang 2 đốt	3,40 ^a	8,80 ^c	0,42 ^c
Mẫu mang 3 đốt	3,39 ^a	12,20 ^b	0,66 ^b
Mẫu mang 4 đốt	3,38 ^a	15,40 ^a	0,82 ^a

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b, c, d) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test

Khảo sát ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh chồi *in vitro*

Những vị trí đốt thân được cấy trên môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA, 50 g/l chuối, 1 g/l than hoạt tính, 30 g/l sucrose, pH 5,8. Khả năng tái sinh chồi *in vitro* từ đốt thân sau 2 tháng nuôi cấy được thể hiện trên Bảng 3. Kết quả cho thấy, tất cả các vị trí đốt thân trên cùng một cây đều tái sinh chồi, tuy nhiên ở những vị trí đốt khác nhau thì có sự tái sinh khác nhau. Các vị trí đốt thân tái sinh từ 4,9 – 5,9 chồi, trong khi đó, đốt thứ nhất không tái sinh chồi mà chỉ sinh trưởng tăng kích thước chiều cao và số lá. Chồi của đốt thứ nhất cao hơn các vị trí đốt khác, điều này có thể giải thích do đốt thứ nhất có tính ưu thế ngọn nên sinh trưởng tăng chiều cao, những vị trí đốt khác do tái sinh nhiều chồi nên sự tăng trưởng chiều cao bị kìm hãm. Về số liệu thì chiều cao chồi tái sinh từ đốt thứ 2, 3, 4, 5 và 6 có sự khác nhau nhưng theo xử lý thống kê thì không có sự khác biệt. Đốt thứ nhất không tái sinh chồi nên có khối lượng tươi thấp nhất (0,13 g/mẫu), những vị trí đốt khác thì cao hơn

(0,23 – 0,27 g/mẫu) và không tuân theo một qui luật tăng từ vị trí đốt đầu tiên đến đốt cuối cùng hay ngược lại. Ngoài trừ đốt thứ nhất, các vị trí đốt còn lại đều có chung đặc điểm là từ đốt thân tái sinh một chồi chính, sau đó sinh trưởng và phát triển tái sinh nhiều chồi mới, từ đốt thân mọc nhiều rễ và rễ có nhiều lông hút (Hình 1e₁, 1e₂, 1e₃, 1e₄, 1e₅, 1e₆). Kết quả này phù hợp với báo cáo của Vũ Quốc Luận *et al.*, (2015) khi nghiên cứu vị trí đốt thân loài *A. setaceus* Blume trên môi trường rắn, sau 3 tháng nuôi cấy kết quả cho thấy, sự tái sinh chồi giữa các đốt thân không tuân theo một qui luật tăng số chồi từ ngọn đến gốc hay ngược lại (từ đốt ngọn đến gốc: 1,00; 1,00; 3,75; 7,02; 6,37; 4,00 chồi/đốt), đốt ngọn do có tính ưu thế ngọn nên sinh trưởng tăng chiều cao, số lá và diện tích lá mà không tái sinh chồi mới, những vị trí đốt thân còn lại mang chồi ngủ và tái sinh nhiều chồi mới. Nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả của Phùng Văn Phê *et al.*, (2010) khi nhân giống loài *A. roxburghii* thông qua nuôi cấy chồi ngọn và chồi nách, kết quả cho thấy, chồi

ngọn tái sinh 1,2 – 2 chồi/mẫu, chồi nách (đốt thân) tái sinh 3 – 4 chồi/mẫu. Như vậy, vị trí đốt thân thứ hai

đến thứ sáu là nguồn vật liệu thích hợp trong nhân giống *in vitro* loài *A. formosanus*.



Hình 1. Nghiên cứu nhân giống và nuôi trồng cây lan gấm (*A. formosanus*): a. Chồi *in vitro*; b. Cây *in vitro*; c₁, c₂, c₃, c₄, c₅, c₆. Tái sinh chồi *in vitro* trên môi trường bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1, 2, 3 mg/l BA; d₁, d₂, d₃, d₄. Tái sinh chồi của mẫu mang một, hai, ba, bốn đốt thân; e₁, e₂, e₃, e₄, e₅, e₆. Tái sinh chồi của các vị trí đốt thứ nhất (chồi ngọn), thứ hai, thứ ba, thứ tư, thứ năm, thứ sáu; f₁, f₂, f₃, f₄. Tái sinh rễ *in vitro* trên môi trường bổ sung 0, 0,1, 0,5, 1 mg/l IBA; g₁, g₂ và h₁, h₂. Cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa và giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn với 50% đất mùn.

Bảng 3. Ảnh hưởng của vị trí đốt thân đến sự tái sinh chồi *in vitro* sau 2 tháng nuôi cấy.

Vị trí đốt	Chiều cao chồi (cm)	Số chồi/mẫu	Khối lượng tươi/mẫu (g)
Chồi ngọn (đốt thứ nhất)	4,30 ^a	1,00 ^c	0,13 ^d
Đốt thứ 2	3,38 ^b	4,90 ^b	0,25 ^{abc}
Đốt thứ 3	3,39 ^b	5,10 ^b	0,26 ^{ab}
Đốt thứ 4	3,37 ^b	5,90 ^a	0,24 ^{ba}
Đốt thứ 5	3,40 ^b	5,80 ^a	0,27 ^a
Đốt thứ 6	3,39 ^b	5,30 ^{ab}	0,23 ^c

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test

Khảo sát ảnh hưởng của IBA đến sự tái sinh rễ *in vitro*

Khả năng tái sinh rễ *in vitro* của chồi ngọn được thể hiện trên bảng 4. Kết quả cho thấy, tất cả các mẫu cây trên môi trường không có chất kích thích sinh trưởng và có chất kích thích trường đều tái sinh rễ, với tỉ lệ 100%, điều này cho thấy cây lan gấm là một đối tượng dễ dàng tái sinh rễ *in vitro*. Tuy nhiên, ở những môi trường khác nhau (0; 0,1; 0,5 và 1 mg/l) thì sự tái sinh rễ có sự khác nhau, môi trường bổ sung 0,1 mg/l IBA có số rễ nhiều nhất, với 3,10 rễ/cây. Theo số liệu số rễ ở môi trường bổ sung 0,5 mg/l IBA (2,70 rễ/cây) và 1 mg/l IBA (2,50 rễ/cây) có sự khác nhau, nhưng theo xử lý thống kê thì không có sự khác biệt. Khi nồng độ IBA tăng 0 – 0,5 mg/l thì chiều dài rễ tăng lên (tương ứng 1,48 cm; 1,54 cm; 1,69 cm) nhưng khi nồng độ IBA tăng lên 1 mg/l thì chiều dài rễ giảm xuống. Điều này cho thấy khi IBA ở nồng độ thấp thì kích thích tăng chiều dài rễ, nhưng khi tăng nồng độ IBA thì xảy ra quá trình

ngược lại. Đặc điểm của cây là sinh trưởng tốt và trên bề mặt rễ có lông tơ (Hình 1f₁, 1f₂, 1f₃, 1f₄). Kết quả của thí nghiệm này tương đương với kết quả đã công bố của Ket (2003) khi nghiên cứu tạo rễ *in vitro* loài *A. formosanus*, tất cả chồi cây ở môi trường không có chất kích thích sinh trưởng đều tái sinh rễ 100%, với 2,00 rễ/cây và những môi trường có bổ sung chất kích thích sinh trưởng thì số rễ dao động từ 2,00 – 2,80 rễ/cây, khi nồng độ IBA từ 0,5 – 3 mg/l. Nguyễn Quang Thạch và Phí Thị Cẩm Miện (2012) cũng nghiên cứu tái sinh rễ *in vitro* loài *A. setaceus*, kết quả cũng cho thấy, tất cả chồi cây trên môi trường không có chất kích thích sinh trưởng cũng đều tái sinh rễ 100%, với 2,04 rễ/cây và những môi trường có bổ sung chất kích thích sinh trưởng thì số rễ dao động từ 1,71 – 2,43 rễ/cây khi nồng độ IBA từ 0,5 – 3 mg/l.

Như vậy, nồng độ IBA từ 0 – 1 mg/l đều thích hợp đến sự tái sinh rễ *in vitro* của loài *A. formosanus*.

Bảng 4. Ảnh hưởng của IBA đến sự tái sinh rễ *in vitro* sau 1 tháng nuôi cấy.

IBA (mg/l)	Số rễ/chồi	Chiều dài rễ (cm)	Tỉ lệ tạo rễ (%)
0,0	2,20 ^b	1,48 ^{bc}	100
0,1	3,10 ^a	1,54 ^{ab}	100
0,5	2,70 ^{ab}	1,69 ^a	100
1,0	2,50 ^{ab}	1,32 ^c	100

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b, c) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong Duncan's test

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến sự thích nghi của cây *in vitro* ở ngoài vườn ươm

Khả năng thích nghi của cây *in vitro* sau 2 tháng nuôi trồng được thể hiện trên bảng 5. Nghiên cứu chuyên cây *in vitro* ra điều kiện vườn ươm là một bước quan trọng quyết định thành công trong nuôi cấy mô thực vật, cây con *in vitro* thường nuôi cấy trên môi trường thạch khi chuyển ra điều kiện vườn ươm bộ rễ phải thích nghi trên giá thể mới. Hơn nữa, độ ẩm trong điều kiện *in vitro* cao hơn và ổn định hơn ở điều kiện vườn ươm, dẫn đến cây con thường bị héo và chết. Vì vậy, trong thời gian đầu cần phải che chắn và phun sương giữ ẩm cho cây. Kết quả cho thấy, tỉ lệ sống của cây con trên giá thể vụn xơ dừa đạt 100%, trong khi đó tỉ lệ sống của cây trồng trên giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% đất mùn chỉ đạt 91,67%. Chiều cao cây và chiều dài rễ của cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa (tương ứng 5,82 cm; 3,64 cm) cũng cao hơn cây trồng trên giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% đất mùn (tương ứng 5,66 cm; 2,13 cm). Đặc điểm rễ của cây trồng trên giá thể vụn xơ dừa có nhiều lông hút bám chặt giá thể, trong khi đó, giá thể 50% vụn xơ

dừa phối trộn 50% đất mùn thì rất ít (Hình 1h₁, 1h₂). Điều này cho thấy, giá thể vụn xơ dừa có độ thoáng và giữ ẩm thích hợp cho cây con thích nghi và sinh trưởng. Ở nước ta hiện nay đã có nhiều công bố nhân giống *in vitro* các loài lan gấm, nhưng nghiên cứu chuyên cây *in vitro* ra điều kiện vườn ươm thì chưa thấy công bố nào đề cập. Kết quả của nghiên cứu này cũng tương đồng với kết quả của Ket *et al.*, (2004) khi nghiên cứu chuyển cây *in vitro* của loài *A. formosanus* ra điều kiện vườn ươm có tỉ lệ sống đạt 100% sau 1 tháng nuôi trồng. Một nghiên cứu khác của Ket (2003) đã sử dụng giá thể xơ dừa phối trộn với than mùn và giá thể xơ dừa phối trộn với đá trân châu để chuyển cây *in vitro* của loài *A. formosanus* ra điều kiện vườn ươm. Bên cạnh đó, Shiao *et al.*, (2002) đã nghiên cứu sử dụng giá thể rêu than bùn chuyển cây *in vitro* của loài *A. formosanus* ra điều kiện vườn ươm, tỉ lệ sống của cây đạt 90% sau 2 tháng nuôi trồng.

Như vậy, sử dụng giá thể vụn xơ dừa để chuyển cây *in vitro* của loài *A. formosanus* ra điều kiện vườn ươm tốt hơn giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% đất mùn.

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể đến sự thích nghi của cây *in vitro* ở ngoài vườn ươm sau 2 tháng nuôi trồng.

Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Tỉ lệ sống (%)
100% vụn xơ dừa	5,82 ^a	3,64 ^a	100
50% vụn xơ dừa + 50% đất mùn	4,66 ^b	2,13 ^b	91,67

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b.) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong T-test.

Khảo sát ảnh hưởng của phân Nitrophoska đến sự sinh trưởng của cây ở ngoài vườn ươm

Khả năng sinh trưởng của cây sau 4 tháng nuôi trồng được thể hiện trên bảng 6. Kết quả cho thấy, tỉ lệ sống của cây ở các nghiệm thức đều đạt 100% và cây sinh trưởng tốt (Hình 2b₁, 2b₂). Tuy nhiên, sự sinh trưởng của cây ở các nghiệm thức khác nhau thì có sự khác nhau, nghiệm thức phun phân Nitrophoska với nồng độ 2 g/l (chiều cao cây 11,20 cm, chiều dài rễ 7,80 cm, khối lượng tươi 1,82 g/cây) tốt hơn ở nồng độ 1 g/l (chiều cao cây 10,00 cm, chiều dài rễ 6,90 cm, khối lượng tươi 1,65 g/cây). Qua đây cho thấy, cây lan

gắm trong quá trình sinh trưởng cần bổ sung những nguyên tố khoáng đa, vi lượng cần thiết. Hiện nay ở nước ta chưa có công bố nghiên cứu nuôi trồng cây lan gấm ở điều kiện vườn ươm. Trên thế giới, Ket (2003) nuôi trồng loài *A. formosanus* ở ngoài vườn ươm đã sử dụng dung dịch dinh dưỡng cho cây mỗi tuần hai lần. Pandey *et al.*, (2006) cũng nuôi trồng cây lan gấm ở ngoài vườn ươm và cũng sử dụng các khoáng đa, vi lượng để phun cho cây.

Như vậy, trong nuôi trồng loài *A. formosanus* sử dụng phân bón lá Nitrophoska ở nồng độ 2 g/l tốt hơn nồng độ 1 g/l.

Bảng 6. Ảnh hưởng của phân Nitrophoska đến sự sinh trưởng của cây ở ngoài vườn ươm sau 4 tháng nuôi trồng.

Phân bón lá	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi/cây (g)	Tỉ lệ sống (%)
1 g/l Nitrophoska	10,00 ^b	6,90 ^b	1,65 ^b	100
2 g/l Nitrophoska	11,20 ^a	7,80 ^a	1,82 ^a	100

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong T-test.

Khảo sát ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng của cây ở ngoài vườn ươm

Khả năng sinh trưởng của cây sau 4 tháng nuôi trồng được thể hiện ở bảng 7. Kết quả cho thấy, tỉ lệ sống của cây trồng trên hai loại giá thể trên đều đạt 100% và cây sinh trưởng tốt (Hình 2d₁, 2d₂), tuy nhiên ở mỗi loại giá thể khác nhau thì có sự sinh trưởng khác nhau. Chiều cao cây và khối lượng tươi của cây trồng trên giá thể dớn mùt (chiều cao 12,50 cm; khối lượng tươi 1,94 g/cây) tốt hơn giá thể vụn xơ dừa (chiều cao 11,00 cm; khối lượng tươi 1,85 g/cây). Theo số liệu chiều dài rễ của cây trồng trên giá thể dớn mùt (8,00 cm) và giá thể vụn xơ dừa (7,60 cm) có sự sai khác, nhưng theo xử lý thống kê thì không có sự khác biệt. Đặc điểm của cây lan gấm là rễ có nhiều lông hút bám chặt giá thể, những đốt phía trên giá thể mọc rễ khí sinh và đâm xuống giá thể (Hình 2e₁, 2e₂). Kết quả của nghiên cứu này tương đồng với kết quả của Ket (2003) khi nuôi trồng loài *A. formosanus* trên giá thể than bùn xơ dừa, sau 5 tháng nuôi trồng kết quả

cho thấy, khối lượng tươi của cây từ 2,0 – 2,7 g/cây, chiều cao của cây từ 8,5 – 10,1 cm; Chang *et al.*, (2007) cũng nuôi trồng loài *A. formosanus* trên giá thể lên men vỏ cây cùng với phân trộn theo phương pháp mới là đặt chậu lan gấm trong túi nylon, kết quả sau 4 tháng nuôi trồng cho thấy, cây nuôi trồng theo phương pháp mới trong túi nylon có chiều cao là 8,1 cm, khối lượng tươi 1,8 g/cây, trong khi đó, cây nuôi trồng theo phương pháp thông thường thì chiều cao cây chỉ đạt 6,3 cm, khối lượng tươi 1,6 g/cây; Cheng và Chang (2009) cũng nghiên cứu nuôi trồng loài *A. formosanus* ở độ cao 1.000 m so với mực nước biển, sau 7 tháng nuôi trồng, khối lượng tươi từ 5 – 6 g/cây, chiều cao cây từ 8 – 9 cm; Bên cạnh đó, Shiau *et al.*, (2002) cũng nghiên cứu nuôi trồng loài *A. formosanus* trong buồng sinh trưởng; Gangaprasad *et al.*, (2000) nghiên cứu nuôi trồng loài *Anoectochilus regalis* ở môi trường rừng tự nhiên.

Như vậy, nuôi trồng loài *A. formosanus* trên dớn mùt tốt hơn giá thể vụn xơ dừa.

Bảng 7. Ảnh hưởng của giá thể đến sự sinh trưởng của cây ở ngoài vườn ươm sau 4 tháng nuôi trồng.

Giá thể	Chiều cao cây (cm)	Chiều dài rễ (cm)	Khối lượng tươi/ cây (g)	Tỉ lệ sống (%)
Vụn xơ dừa	11,00 ^b	7,60 ^a	1,85 ^b	100
Dớn mùt	12,50 ^a	8,00 ^a	1,94 ^a	100

Chú thích: *Những chữ khác nhau (a, b) trong cùng một cột biểu diễn sự khác nhau có ý nghĩa với $P \leq 0,05$ trong T-test



Hình 2. Nghiên cứu nhân giống và nuôi trồng cây lan gấm (*A. formosanus*): a. Cây con đã thích nghi ở điều kiện vườn ươm; b₁, b₂ và c₁, c₂. Cây được phun phân Nitrophoska với nồng độ 2 g/l và 1 g/l; d₁, d₂ và e₁, e₂. Cây trồng trên giá thể dớn và giá thể vụn xơ dừa; f. Nuôi trồng cây lan gấm trong chậu.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu tái sinh chồi và rễ *in vitro*: môi trường MS bổ sung 1 mg/l BA, 50 g/l chuối, 30 g/l sucrose, 1 g/l than hoạt tính, 9 g/l agar, pH 5,8 là tốt nhất cho sự tái sinh chồi; mẫu mang một đốt thân là nguồn vật liệu thích hợp nhất trong nhân giống; vị trí đốt thân thứ hai đến thứ sáu là nguồn vật liệu thích hợp trong nhân giống; nồng độ IBA từ 0 – 1 mg/l đều thích hợp cho sự tái sinh rễ. Trong nuôi trồng cây lan gấm: giá thể vụn xơ dừa thích hợp chuyển cây *in vitro* ra ngoài vườn ươm hơn giá thể 50% vụn xơ dừa phối trộn 50% đất mùn;

phun phân bón lá Nitrophoska với nồng độ 2 g/l tốt hơn nồng độ 1 g/l; giá thể dớn mùt trồng cây tốt hơn giá thể vụn xơ dừa.

Lời cảm ơn: Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Nghiên cứu Khoa học Tây Nguyên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã hỗ trợ cho chúng tôi hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ Khoa học và Công nghệ (2007) Sách đỏ Việt Nam – Phần Thực vật. NXB Khoa học Tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội.

- Chow HT, Hsieh WC, Chang CS (1982) *In vitro* propagation of *Anoectochilus formosanus*. *J Sci Eng* 19:155-166.
- Chang DCL, Chou LC, Lee GC (2007) New cultivation methods for *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Orchid Sci Biotechnol* 1(2): 56-60.
- Cheng SF, Chang DCN (2009) Growth responses and changes of active components as influenced by elevations and orchid mycorrhizae on *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Botanical Studies* 50: 459-466.
- Duncan DB (1955) Multiple range and F tests. *Biometrics* 11: 1-42.
- Du XM, Irino N, Uto T, Morinaga O, Shoyama Y (2008) Micropropagation of *Anoectochilus formosanus* Hayata *in vitro* and pharmacological and chemical investigations. *Phytochemistry* 9: 79-87.
- Đỗ Mạnh Cường, Vũ Quốc Luận, Nguyễn Việt Cường, Nguyễn Thanh Sang, Nguyễn Hồng Hoàng, Hồ Thanh Tâm, Nguyễn Xuân Tuấn, Trần Hiếu, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Thị Kim Loan, Dương Tấn Nhựt (2015) Ảnh hưởng của một số yếu tố lên quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lan gấm (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy *in vitro*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 13(3): 337-344.
- Gangaprasad A, Latha PG, Seeni S (2000) Micropropagation of terrestrial orchids, *Anoectochilus sikkimensis* and *Anoectochilus regalis*. *Indian J Exp biol* 38(2): 149-154.
- Gupta S, Khanna VK, Singh R, Garg GK (2004) Identification of *in vitro* responsive immature embryo size for plant regeneration in Sudan grass (*Sorghum sudanenses* Piper). *Indian J Biotechnol* 3: 124-127.
- Ho CK, Chang SH, Chen ZZ (1987) Tissue culture and acclimatization in *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Bull Taiwan For Res Inst* 2: 83-105.
- Ket NV (2003) Effect of Environmental Conditions on *In vitro* and *Ex vitro* Growth of Jewel Orchid (*Anoectochilus formosanus* Hayata). PhD Thesis of Philosophy in Agriculture, The Graduate School of Chungbuk National University, Korea.
- Ket NV, Hahn EJ, Park SY, Chakrabarty D, Paek KY (2004) Micropropagation of an endangered orchid *Anoectochilus formosanus*. *Biologia Plantarum* 48 (3): 339-344.
- Murashige T, Skoog F (1962) Arevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. *Plant Physiol* 15: 473-497.
- Mazri MA (2013) Effect of basal medium, explants size and density on the *in vitro* proliferation and growth of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar '16-bis'. *Not Sci Biol* 5(3): 332-337.
- Nghị định số 32/2006/NĐ-CP (2006) Chính Phủ Nước Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam.
- Nguyễn Quang Thạch, Phí Thị Cẩm Miện (2012) Nghiên cứu kỹ thuật nhân giống loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) *in vitro* bảo tồn nguồn dược liệu quý. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 10(4): 579-603.
- Phạm Hoàng Hộ (2000) Cây cỏ Việt Nam, quyển III, NXB TP. Hồ Chí Minh.
- Pandey DM, Yu KW, Wu RZ, Hahn EJ, Paek KY (2006) Effects of different irradiances on the photosynthetic process during *ex vitro* acclimation of *Anoectochilus* plantlets. *Photosynthetica* 44(3): 419-424
- Phùng Văn Khê, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Trung Thành (2010) Nghiên cứu kỹ thuật nhân nhanh chồi *in vitro* loài lan Kim tuyến *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 26: 248-253.
- Phan Xuân Bình Minh, Phạm Hương Sơn, Trần Minh Hội, Nguyễn Thị Vân (2015) Nghiên cứu nhân giống nhằm bảo tồn lan sứa (*Anoectochilus lylei* Rolfe ex Downies). *Hội nghị khoa học toàn quốc về sinh thái và tài nguyên sinh vật lần thứ sáu*, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ, Hà Nội: 695-699.
- Shahinul Islam SM (2010) Effect of embryo age, size and shape for improvement of regeneration efficiency from microspore-derived embryos in wheat (*Triticum aestivum* L.). *POJ* 3(5): 149-153
- Shiau YJ, Sagare AP, Chen UC, Yang SR, Tsay HS (2002) Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by artificial cross-pollination and *in vitro* culture of seeds. *Bot Bull Acad Sin* 43: 123-130.
- Tai KS (1987) *In vitro* propagation of *Anoectochilus formosanus* (Hayata). *J Agric Asso China* 137: 42-54.
- Trương Thị Bích Phượng, Phan Ngọc Khoa (2013) Nhân giống *in vitro* cây lan kim tuyến (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl). *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế* 79(1): 41-46.
- Trần Thị Hồng Thúy, Đỗ Thị Gấm, Nguyễn Khắc Hưng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà (2015) Nghiên cứu nhân nhanh *in vitro* loài lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) thông qua cảm ứng tạo protocorm like bodies. *Tạp chí Sinh học* 37(1): 67-83.
- Võ Văn Chi (1997) Từ điển Cây thuốc Việt Nam. NXB Y học.
- Vũ Quốc Luận, Trần Đình Phương, Trần Công Luận, Dương Tấn Nhựt (2015) Vi nhân giống và định tính hoạt chất β -sitosterol trên cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume). *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 13(4): 1113-1125.
- Wu RZ, Baque MA, Paek KY (2010) Establishment of a large-scale micropropagation system for *Anoectochilus formosanus* in bioreactors. *Acta Hort* 878:167-173.
- Yoon YJ, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY (2007) Biomass production of *Anoectochilus formosanus* Hayata in a bioreactor system. *J Plant Biol* 50(5): 573-576.

STUDY ON *IN VITRO* SHOOT REGENERATION AND CULTIVATION OF *ANOECTOCHILUS FORMOSAUS* HAYATA

Phan Xuan Huyen, Nguyen Thi Phuong Hoang

Tay Nguyen Institute for Scientific Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Anoectochilus formosanus Hayata is one of the precious and good herb for human health. In this study, we investigated *in vitro* shoot regeneration and cultivation of *Anoectochilus formosanus*. The results showed that MS medium supplemented with 1 mg/l BA, 50 g/l banana, 1 g/l activated charcoal, 30 g/l sucrose, pH 5.8 was the best for *in vitro* shoot regeneration, with 5.20 shoots/explant, height of 3.38 cm, fresh weight of 0.26 g/explant. Explants contained one stem node were the most suitable source of material for *in vitro* propagation. Second stem nodes to sixth stem nodes proved suitable materials for *in vitro* propagation. Concentration of IBA from 0 to 1 mg/l were appropriate for *in vitro* root regeneration, with root regeneration rate of 100%. Coconut fiber powder was the suitable substrate to transfer the plantlets to the greenhouse, with height of 3.38 cm, root length of 3.64 cm, survival rate of 100%. For experiments in cultivating *Anoectochilus formosanus* at *ex vitro* condition, the result showed that, sprayed fertilizer of Nitrophoska with concentrations of 2g/l periodically once a week was the best for plant growth, with height of 11.20 cm, root length of 7.80 cm, fresh weight of 1.82 g/plant, survival rate of 100%, and used substrate of fern fiber cultivating *Anoectochilus formosanus* was the best, with height of 12.50 cm, root length of 8.00 cm, fresh weight of 1.94 g/plant, survival rate of 100%.

Keywords: *Anoectochilus formosanus*, fertilizer, plant growth, shoot regeneration, substrate